

**UJI AKTIVITAS SELULOLITIK
DARI TIGA ISOLAT BAKTERI *Bacillus* sp.
GALUR LOKAL RIAU**

Ariani Gusti Rahayu, YuliHaryani, Fifi Puspita

**Mahasiswa Program Studi S1 Kimia
Bidang Biokimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau
Kampus Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia
arianigustirahayu@gmail.com**

ABSTRACT

Cellulolytic bacteria are bacteria that have ability to hydrolize cellulose into smaller oligosaccharides and into glucose units. Glucose is used as a source of carbon and energy for bacterial growth. The aims of this study was to determine the ability of three *Bacillus* sp. bacteria from rhizosphere of mustard plants (*Bacillus* sp. B1), rhizosphere of rice plants (*Bacillus* sp. B2), and peat soil of Giam Siak Kecil (*Bacillus* sp. B3) to produce cellulase enzymes based on clear zone which is seen surrounding the colonies. Cellulolytic activity of the bacteria was determined by their ability bacteria to degrade *carboxymethyl cellulose* (CMC) substrate. The results showed that all isolates tested were able to produce cellulase. *Bacillus* sp. B1 isolate had the highest cellulolytic activity [$(6.502 \pm 0.462) \times 10^{-3} \text{U/mL}$] than 2 isolates based on 24 hour production time and 120 rpm speed of agitation.

Keywords: Carboxymethyl cellulose (CMC), cellulase, cellulolytic bacteria, Congo red.

ABSTRAK

Bakteri selulolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan menghidrolisis kompleks selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil dan akhirnya menjadi glukosa. Glukosa digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi bagi pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tiga bakteri *Bacillus* sp. asal rizosfer tanaman Sawi (*Bacillus* sp. B1), *Bacillus* sp. asal rizosfer tanaman padi (*Bacillus* sp. B2), dan *Bacillus* sp. asal tanah gambut Giam Siak kecil (*Bacillus* sp. B3) dalam menghasilkan enzim selulase berdasarkan zona bening yang terlihat disekitar koloni. Aktivitas selulolitik ditentukan oleh kemampuan bakteri untuk menghidrolisis substrat *carboxymethyl cellulose* (CMC). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga isolat ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim selulolitik. Isolat bakteri *Bacillus* sp. B1 menghasilkan aktivitas selulolitik tertinggi sebesar $(6,502 \pm 0,462) \text{U/mL}$ dibandingkan 2 isolat lainnya berdasarkan waktu produksi 24 jam dan kecepatan agitasi 120 rpm.

Kata kunci: *Carboxymethyl cellulose* (CMC), selulase, bakteri selulolitik, *Congo red*.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan bakteri selulolitik sebagai penghasil enzim selulase digunakan untuk menghidrolisis selulosa karena bakteri tersebut menghasilkan enzim selulase sebagai respon terhadap adanya selulosa pada lingkungannya. Proses ini berlangsung apabila terjadi kontak langsung antara sel bakteri dan permukaan selulosa (Hartanti, 2010).

Enzim selulase dapat dihasilkan oleh bakteri dan fungi. Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim selulase adalah *Bacillus sp.* (Sadhu *et al.*, 2013). Selulase dapat diaplikasikan untuk memperhalus bubur kertas pada industri kertas, menjaga warna kain agar tetap cemerlang pada industri tekstil, meningkatkan kualitas pada industri pangan, sebagai dekomposer bahan-bahan organik, meningkatkan nutrisi pakan ternak, berperan penting dalam biokonversi selulosa menjadi berbagai komoditas senyawa kimia dan dapat mengurangi dampak negatif dari polusi limbah terhadap lingkungan (Hartanti, 2010).

Enzim selulase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan di dalam sel kemudian dikeluarkan ke media tumbuhnya. Selulase dapat menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik pada selulosa. Enzim Selulase dapat diklasifikasikan menjadi tiga kelompok, yaitu endo-1,4- β -D-glukanase, ekso-1,4- β -D-glukanase, dan β -D-glukosidase. Ketiga komponen enzim tersebut bekerjasama dalam menghidrolisis selulosa yang tidak dapat larut menjadi glukosa (Fikrinda, 2000).

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bacillus sp.* asal rizosfer tanaman Sawi (*Bacillus sp.* B1),

Bacillus sp. asal rizosfer tanaman padi (*Bacillus sp.* B2), dan *Bacillus sp.* asal tanah gambut Giam Siak kecil (*Bacillus sp.* B3) yang merupakan bakteri koleksi dari Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, UR.

METODE PENELITIAN

a. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autoklaf (*ALL American mode 25X-2*), spektrofotometer UV-VIS (*Thermoscientific genesys 10*) UV-Vis, waterbath (*Grant Instrument Type SUB28*), Shaking Incubator (*Labtech Model LS1-3016R Serial No. BACILLUS SP. B110221102*), Incubator (Meyert), centrifuge scientific model 228, vortex (H-VM-300), Microcentrifuge (*Hareous Instrument Biofuge Pico D-37520 Osterode*), oven (*Fisher Scientific mode 655F*), pH meter (*Hanna Instrument D6450*), Corning Syringe filter PES 0,45 μ m, Whatman GF/C (cat. No. 1822055), micro tube dan peralatan gelas laboratorium standar lainnya sesuai dengan prosedur.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nutrient Broth (NB) (Merck, No. Kat. 1.05443.0500), Nutrient Agar (NA) (Merck, No. Kat. 1.05450.0500), Carboxymethyl cellulose (CMC) (Brataco Chemika J1438/4), Congo red, agar batang, NaN_3 , reagen Nelson-Somogyi, reagen Arsenomolibdat, dan bahan-bahan lain sesuai dengan prosedur kerja.

b. Uji kualitatif mikroba selulolitik

Uji kualitatif mikroba selulolitik dilakukan dengan cara melihat adanya zona bening pada media padat selektif CMC 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama \pm 24 jam. Uji kualitatif pada media padat selulase yang mengandung 1% CMC (1 g CMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; 0,002 g K_2HPO_4 ; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g agar batang) (Meryandini *et al.*, 2009). dalam larutan buffer fosfat 100 mL. Isolat yang terlihat atau tumbuh pada media selektif kemudian ditambahkan 5 mL *congo red* 0,1% dengan cara dituang secara merata keseluruh permukaan media selektif dan dibiarkan selama 1 hari, setelah 1 hari warna dicuci dengan NaCl 1M dan dilakukan pengamatan.

c. Pembuatan stok inokulum bakteri selulolitik

Bakteri hasil peremajaan 1 tabung agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 mL media (NB), kemudian diinkubasi di dalam *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 150 rpm pada suhu 37°C selama 18 jam. Suspensi dari bakteri ini kemudian digunakan sebagai starter dan selanjutnya dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 660 nm untuk menghitung jumlah pertumbuhan sel dari masing masing bakteri. Inokulum dengan OD sebesar 0,5 dimasukkan masing-masing ke dalam media produksi cair enzim selulase dan diinkubasi berdasarkan variasi waktu yang telah ditentukan.

d. Produksi enzim selulase

Komposisi media cair untuk produksi enzim selulase yang mengandung 1% CMC (1 g CMC; 0,02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,075 g KNO_3 ; 0,002 g K_2HPO_4 ; 0,004 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; *yeast extract* 0,2 g; 1,5 g agar batang), Semua bahan dilarutkan dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7 sebanyak 100 mL dan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 15 lb, 121°C selama 20 menit. Media siap digunakan apabila tidak ada tanda-tanda kontaminasi setelah diinkubasi satu malam pada suhu kamar. Produksi enzim selulase dilakukan dengan cara menginokulasikan inokulum isolat bakteri *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B3 sebanyak 10% ke media cair produksi enzim selulase. Kultur cair ini diinkubasi pada *shaking incubator* dengan kecepatan agitasi 120 rpm pada suhu 37°C dengan variasi waktu inkubasi 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, dan 36 jam. Masing-masing kultur yang mengandung enzim dipisahkan dari bakteri menggunakan sentrifugasi dalam keadaan dingin 9500 rpm selama 10 menit. Sebelum disentrifugasi, media kultur berisi enzim tersebut didinginkan selama 1 jam. Supernatan disaring dengan *filter glass fiber* (whatman GF/C) dan disterilisasi dengan *Corning syringe filter* 0,45 μm , kemudian ditambahkan NaN_3 hingga konsentrasi 0,0065 % (b/v) ke dalam setiap larutan supernatan jika enzim tidak langsung digunakan.

e. Aktivitas enzim selulase

Uji aktivitas enzim selulase ekstraselular dilakukan dengan menghitung kadar glukosa hasil dari hidrolisis selulosa menggunakan enzim selulase dengan metode Nelson-

Somogyi. Tabung untuk sampel diisi dengan 0,5 mL larutan substrat *Carboxymethyl cellulose* (CMC) 2% yang dilarutkan pada larutan buffer fosfat pH 7. Kemudian diinkubasi selama 5 menit dalam *waterbath* suhu 40°C. Tabung sampel tersebut kemudian diisi dengan larutan enzim 0,5 mL dan diinkubasi selama 30 menit sambil sekali-sekali diaduk pelan-pelan.

Tabung kontrol dimasukkan kedalam *waterbath* dalam keadaan kosong, kemudian diinkubasi selama 5 menit. Setelah 5 menit, tabung tersebut diisi dengan larutan substrat CMC 0,5 mL dari larutan substrat CMC 2% yang dilarutkan menggunakan larutan buffer fosfat pH 7 kemudian diinkubasi selama 30 menit.

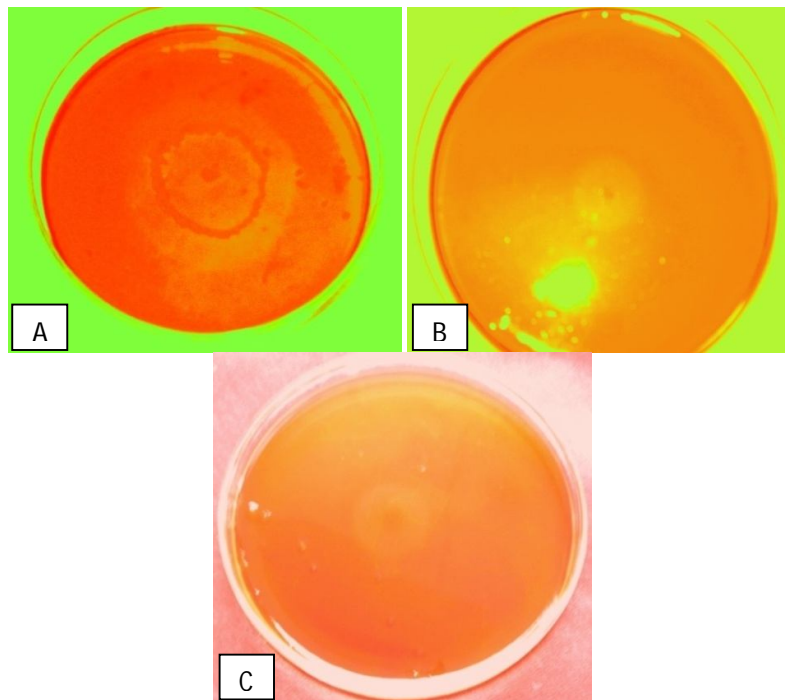
Tabung sampel dan tabung kontrol dikeluarkan dari dalam *waterbath* setelah 30 menit waktu inkubasi. Masing-masing tabung ditambahkan 0,5 mL reagen Nelson-Somogyi lalu larutan dihomogenisasi dan pada tabung kontrol selanjutnya ditambahkan larutan enzim sebanyak 0,5 mL. Semua tabung dipanaskan selama 20 menit dalam air mendidih dan kemudian didinginkan pada suhu kamar, lalu ditambahkan 0,5 mL reagen arsenomolibdat dan dihomogenisasikan kembali. Setelah itu didiamkan 5 menit. Setiap tabung diberi 3 mL akuades dan didiamkan selama 30 menit. Larutan disentrifugasi jika terdapat endapan pada 9500 rpm selama 10 menit. Sebagai blanko digunakan 0,5 mL larutan buffer fosfat pH 7 (0,05 M) yang diperlukan sama dengan sampel, tetapi tidak diinkubasi. Sebagai standar

dibuat larutan glukosa pada berbagai konsentrasi dengan metode Nelson-Somogyi. Absorbansi masing-masing larutan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 540 (Clark & Switzer, 1997).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji kualitatif mikroba selulolitik

Pengujian adanya aktivitas selulolitik ditunjukkan dengan visualisasi zona bening disekitar koloni pada media CMC agar setelah diberi pewarna *congo red*. Hasil uji menunjukkan bahwa ketiga isolat mampu menghasilkan zona bening. Kemampuan bakteri menghasilkan zona bening pada media spesifik selulolitik menandakan bahwa bakteri mampu menghasilkan enzim selulase. Besarnya zona bening yang dihasilkan pada ketiga isolat bakteri menunjukkan perbedaan. Hal ini berhubungan dengan kemampuan masing-masing isolat bakteri menghasilkan enzim selulase. Isolat bakteri yang memiliki aktivitas enzim selulase yang tinggi dapat menghidrolisis selulosa menjadi glukosa dan menunjukkan zona bening yang besar disekitar koloni. Hal ini dikarenakan perubahan struktur selulosa yang berserat menjadi glukosa dengan struktur menjadi non serat. Media CMC yang terhidrolisis oleh enzim selulase jika digenangi oleh pewarna *congo red* tidak akan terwarnai. Interaksi ini berlangsung secara non-kovalen. *Congo red* dijadikan indikator terjadinya degradasi β -D-glukan dalam media agar (Hartanti, 2010).

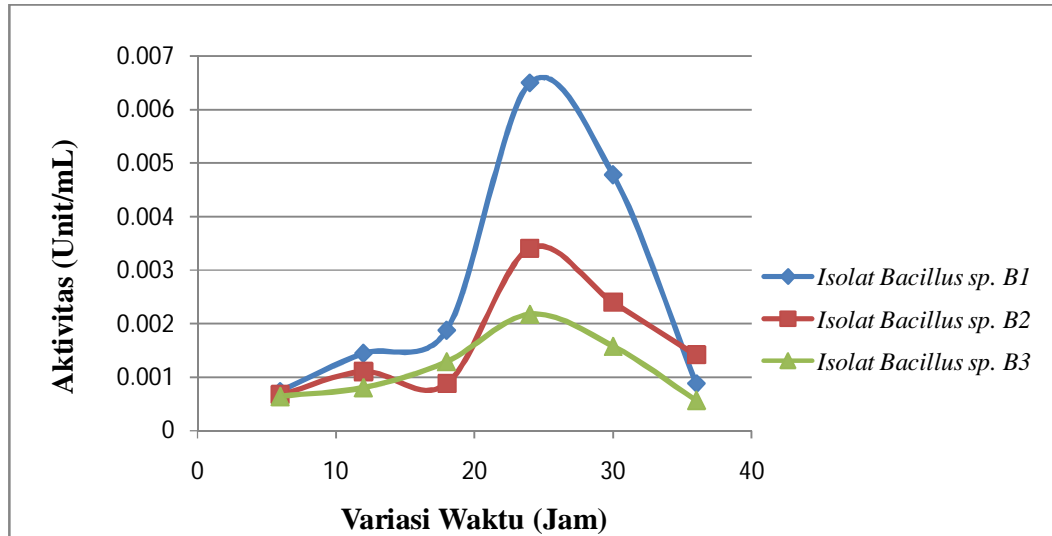


Gambar 1. Hasil uji kualitatif mikroba selulolitik isolat bakteri *Bacillus* sp. B1(A), isolat bakteri *Bacillus* sp. B2 (B), dan isolat bakteri *Bacillus* sp. B3 (C).

Tabel 1. Variasi waktu produksi enzim terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B3 pada suhu 37°C dan agitasi 120 rpm.

Variasi Waktu (Jam)	Aktivitas Enzim ($\times 10^{-3}$ Unit/mL)*		
	<i>Bacillus</i> sp. B1	<i>Bacillus</i> sp. B2	<i>Bacillus</i> sp. B3
6	$0,741 \pm 0,061^e$	$0,679 \pm 0,303^d$	$0,648 \pm 0,111^d$
12	$1,451 \pm 0,214^d$	$1,111 \pm 0,216^{cd}$	$0,813 \pm 0,201^d$
18	$1,883 \pm 0,111^c$	$0,885 \pm 0,128^d$	$1,296 \pm 0,061^c$
24	$6,502 \pm 0,462^a$	$0,416 \pm 0,339^a$	$2,181 \pm 0,188^a$
30	$4,784 \pm 0,134^b$	$2,407 \pm 0,222^b$	$1,584 \pm 0,178^b$
36	$0,885 \pm 0,117^e$	$1,418 \pm 0,123^c$	$0,576 \pm 0,170^d$

Catatan: *) Rata-rata nilai aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari tiga kali pengulangan. Pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat 5% ($\alpha \leq 0,05$) pada kolom yang sama berdasarkan uji Duncan jarak berganda.



Gambar 2. Grafik hubungan waktu produksi terhadap aktivitas selulase dari *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B3 pada suhu 37°C dan agitasi 120 rpm.

2. Uji aktifitas enzim selulase dari *Bacillus* sp B1, *Bacillus* sp B2, dan *Bacillus* sp B3

Analisis aktivitas ekstrak kasar enzim selulase dari ketiga isolat yaitu *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B3 ditentukan dengan metode Nelson-Somogyi. Hasil produksi enzim selulase dari ketiga isolat ditunjukkan dengan nilai aktivitas enzim tertinggi yang diperoleh pada saat waktu inkubasi produksi enzim selulase 24 jam dengan suhu 37°C dan konsentrasi CMC sebesar 1% pada pH 7. Aktivitas enzim dinyatakan sebagai jumlah gula pereduksi yang dilepaskan oleh kerja enzim per satuan waktu.

Bakteri selulolitik menghasilkan kompleks enzim selulase yang berbeda-beda, tergantung dari gen yang dimiliki

dan sumber karbon yang digunakan (Meryandini *et al.*, 2009).

Selulosa yang digunakan pada penelitian ini adalah substrat selulosa komersil yaitu *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) dengan konsentrasi 1%. CMC merupakan substrat terbaik untuk menginduksi sintesis enzim selulolitik ekstraseluler (Alam *et al.* 2004) dan berdasarkan Narasimha *et al.* (2005), konsentrasi selulosa 1% merupakan konsentrasi yang optimum untuk produksi selulase.

Secara umum mikroorganisme selulolitik adalah kelompok bakteri yang memiliki tingkat pertumbuhan sel yang cepat, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk produksi enzim juga lebih pendek. Produksi enzim selulase dari ketiga isolat dilakukan dengan

variasi waktu produksi enzim selulase. Dilakukan 6 variasi waktu dengan rentang waktu 6 jam yaitu dimulai dari produksi enzim 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, dan 36 jam. Waktu fermentasi/inkubasi yang menunjukkan aktivitas tertinggi merupakan kondisi saat enzim bekerja secara maksimal pada jangka waktu inkubasi/fermentasi. Sehingga didapatkanlah nilai aktivitas tertinggi yaitu pada saat waktu optimum untuk panen enzim.

Selama pengamatan aktivitas enzim setiap 6 jam selama 36 jam didapatkan aktivitas enzim untuk ketiga isolat terus meningkat sampai pada waktu inkubasi/fermentasi 24 jam dan pada saat inkubasi/fermentasi 30 jam ketiga isolat mengalami penurunan aktivitas enzim. Hasil penelitian aktivitas enzim pada waktu produksi 24 jam memperlihatkan aktivitas tertinggi dari masing-masing isolat. Hal ini diduga terjadinya interaksi yang kuat antara terbentuknya sel (pertumbuhan sel) dan terbentuknya produk dalam fermentasi.

Menurut Mousdale *et al.* (1999), produk fermentasi dibedakan menjadi dua, yaitu produk yang berhubungan dengan pertumbuhan sel (*growth-associated*) dan produk yang tidak berhubungan dengan pertumbuhan sel (*growth-independent*). *Growth-associated* merupakan fermentasi saat produk yang terbentuk akibat aktifnya pertumbuhan sel atau sebaliknya. *Growth-independent* merupakan fermentasi saat produk yang terbentuk bukan akibat aktifnya pertumbuhan sel.

Isolat *Bacillus* sp. B1 menghasilkan aktivitas enzim tertinggi yaitu sebesar $(6,502 \pm 0,462) \times 10^{-3} \text{U/mL}$, sedangkan aktivitas untuk isolat bakteri *Bacillus* sp. B2 dan *Bacillus* sp. B2 adalah masing-masing secara berturut-turut yaitu $(0,416 \pm$

$0,339) \times 10^{-3} \text{Unit/mL}$ dan $(2,181 \pm 0,188) \times 10^{-3} \text{U/mL}$. Hasil ini berbeda secara signifikan ($\alpha \leq 0,05$) antara variasi waktu produksi lainnya pada ketiga isolat bakteri.

KESIMPULAN

Hasil uji kualitatif dari isolat bakteri *Bacillus* sp. asal rizosfer tanaman Sawi (*Bacillus* sp. B1), *Bacillus* sp. asal rizosfer tanaman padi (*Bacillus* sp. B2), dan *Bacillus* sp. asal tanah gambut Giam Siak Kecil (*Bacillus* sp. B2) menunjukkan bahwa ketiga isolat ini positif bakteri selulolitik. Nilai aktivitas selulase terbaik dengan media produksi *Carboxymethyl cellulose* (CMC) 1% diperoleh pada waktu optimum 24 jam untuk ketiga isolat *Bacillus* sp. B1, *Bacillus* sp. B2, dan *Bacillus* sp. B2. Isolat bakteri *Bacillus* sp. B1 menghasilkan aktivitas selulolitik tertinggi berdasarkan waktu optimum $(6,502 \pm 0,462) \times 10^{-3} \text{U/mL}$ dibandingkan 2 isolat lainnya berdasarkan waktu optimum dengan agitasi 120 rpm. Hasil ini berbeda secara signifikan ($\alpha \leq 0,05$) dengan 2 isolat bakteri lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ibu Yuli Haryani, M.Sc, Apt dan Ibu Ir.Fifi Puspita, M.P selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu memberikan bimbingan, dukungan, dan petunjuk selama penelitian dan penulisan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

Alam, M.Z., Manchur, M.A., & Anwar, M.N. 2004. Isolation,

- purification, characterization of cellulolytic enzymes produced by *Streptomyces omiyaensis*. *Journal of Biological Science* **10**: 1647- 1653.
- Clark, J. M. dan Switzer, R. L. 1977. *Experimental Biochemistry*. 2nd edition. WH. Freeman & Co. San Fransisco.
- Fikrinda, 2000. Isolasi dan karakterisasi Bakteri Penghasil Selulase Ekstermofilik dari Ekosistem Air hitam. *Tesis* Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Hartanti, 2010. Isolasi dan Seleksi Bakteri Selulolitik Termofilik dari Kawah Air Panas Gunung Pancar, Bogor. *Skripsi* FMIPA IPB, Bogor.
- Jacob, F. & Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of protein. *Journal of Molecular and Biological* **3**: 318-356.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T.C., Rachmania, N., & Satria, H. 2009. Isolasi Bakteri selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. *Makara sains* **13**(1): 33-38.
- Mousdale, D.M., J.C. Melville & Fischer. 1999. Optimization of fermentation processes by quantitative analysis. *Analytical biochemistry to chemical engineering*. London.
- Narasimha, G. 2005. Nutrient effects on productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Journal Biotechnol* **5**: 472-476.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S., & Miti, T. 2013. Production, Purification and Characterization of Novel Thermotolerant Endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* Strain Isolated from Cow Dung. *Springerplus Jurnal*. India.

